

## JP2000119300

Publication Title:

IMMOBILIZED PROTEIN, ITS PRODUCTION AND DENATURING  
TREATMENT OF IMMOBILIZED PROTEIN

Abstract:

Abstract of JP2000119300

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To produce the subject protein capable of carrying out the complete reversion of the denaturation due to immobilization at one site of the carboxyl terminal and through a main chain by immobilizing the protein through the carboxyl group at the carboxyl terminal thereof. **SOLUTION:** This protein is represented by the formula  $\text{NH}_2\text{-R1-CO-NH-R2-CO-NH-Y}$  (R1 and R2 are each an amino acid sequence; and Y is an immobilizing carrier) and immobilized on the immobilizing carrier at one site of the carboxyl terminal of a protein main chain. The protein is produced by binding a protein represented by the formula  $\text{NH}_2\text{-R1-COOH}$  to the peptide represented by formula I (X is OH, an amino acid or an amino acid sequence), cyanating SH of the resultant fusion protein represented by formula II and subsequently reacting a cyano-containing protein represented by formula III with the immobilizing carrier represented by the formula  $\text{NH}_2\text{-Y}$ . The fusion protein represented by formula II is prepared by binding, e.g. a gene encoding the protein represented by the formula  $\text{NH}_2\text{-R1-COOH}$  to a gene encoding the peptide sequence represented by formula I, preparing a gene encoding the protein represented by formula II and then expressing the resultant gene in a host organism.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-119300

(P2000-119300A)

(43)公開日 平成12年4月25日(2000.4.25)

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | テマコード*(参考)      |
|--------------------------|-------|---------------|-----------------|
| C 0 7 K 17/12            | Z N A | C 0 7 K 17/12 | Z N A 4 B 0 3 3 |
| 1/02                     |       | 1/02          | 4 H 0 4 5       |
| C 1 2 N 11/12            |       | C 1 2 N 11/12 |                 |

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平10-283669

(22)出願日 平成10年10月6日(1998.10.6)

(71)出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72)発明者 巖倉 正寛

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術

院生命工学工業技術研究所内

(74)指定代理人 220000404

工業技術院生命工学工業技術研究所長

Fターム(参考) 4B033 NA03 NA23 NB03 NB12 NB45

NB62 NC03 ND20 NF03

4H045 AA10 AA20 BA10 BA41 BA60

DA89 FA51 FA65 FA67 FA81

GA06 GA23

(54)【発明の名称】 固定化蛋白質、固定化蛋白質を生成させる方法及び固定化蛋白質の変性処理方法

## (57)【要約】

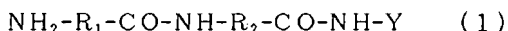
【課題】 蛋白質配列のカルボキシ末端を特異的に固定化担体に結合することにより蛋白質を固定化する新規な方法、及び該方法により作製されたカルボキシ末端だけが固定化された固定化蛋白質を提供する。

【解決手段】一般式(2)  $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-COOH}$  で表される蛋白質に、一般式(3)  $\text{NH}_2\text{-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-X}$  で表されるペプチドを結合させて、一般式(4)  $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-X}$  で表される融合蛋白質を作製し、この融合蛋白質のSH基をシアノ化し、得られた一般式(5)  $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SCN)-CO-X}$  で表されるシアノ基を有する蛋白質を、一般式(6)  $\text{NH}_2\text{-Y}$  で表される固定化担体に作用させて、一般式(1)  $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-Y}$  で表される固定化蛋白質を生成させる。

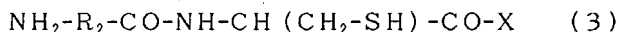
〔上記各式中、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は任意のアミノ酸配列を表し、XはOH又は任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表し、Yは任意の固定化担体を表す。〕

## 【特許請求の範囲】

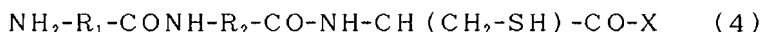
## 【請求項1】 一般式(1)



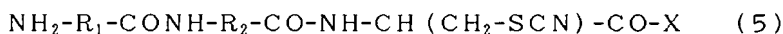
で表される固定化蛋白質。〔式中、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は任意の



で表されるペプチドを結合させて、一般式(4)



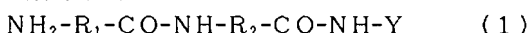
で表される融合蛋白質を作製し、この融合蛋白質のSH基をシアノ化し、得られた一般式(5)



で表されるシアノ基を有する蛋白質を、一般式(6)

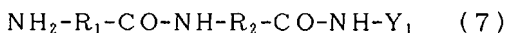


で表される固定化担体に作用させることを特徴とする、一般式(1)



で表される固定化蛋白質を生成させる方法。〔上記各式中、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は任意のアミノ酸配列を表し、XはOH又は任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表し、Yは任意の固定化担体を表す。〕

## 【請求項3】 一般式(7)



で表される固定化蛋白質を変性処理後、変性処理前の条件下に戻すことを特徴とする機能を損なわない固定化蛋白質の変性処理方法。〔式中、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は任意のアミノ酸配列を表し、 $\text{Y}_1$ は変性条件下において安定な固定化担体を表す。〕

【請求項4】 変性処理が加熱殺菌処理であることを特徴とする請求項3に記載の固定化蛋白質の変性処理方法。

## 【発明の詳細な説明】

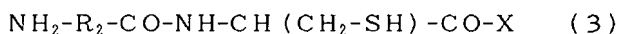
## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、固定化蛋白質の分野に属する。

## 【0002】

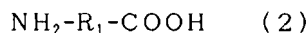
【従来の技術】蛋白質の広範囲な利用法特に繰り返して利用することを目的として、可溶性の蛋白質を、例えばアガロースゲルなどの不溶性の担体と結合させ、固定化蛋白質とする利用が試みられている。例えば、レセプター蛋白質を固定化し、レセプターが認識するリガンドの検出を表面プラズモン共鳴現象で検出する装置(商品名:ピアコア)とか、酵素蛋白質を不溶性担体に結合した固定化酵素の開発及びそれを利用した酵素反応器の作製などが行われている。

【0003】酵素の固定化には、蛋白質を構成するアミノ酸の側鎖の反応性を利用して、不溶性担体と化学的に結合することが主に行われている。例えば、システイン残基には、官能基としてSH基がある。SH基の反応として、ジスルヒド化、アルキル化、アシル化などが知られており、この反応性を利用することにより、システイン残基の側鎖を介して蛋白質の固定化を行うことができ



アミノ酸配列を表し、Yは任意の固定化担体を表す。〕

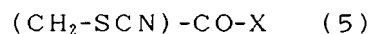
## 【請求項2】 一般式(2)



で表される蛋白質に、一般式(3)



をシアノ化し、得られた一般式(5)



る。また、リジン残基は、アミノ基を側鎖に有する。このアミノ基は、カルボジイミドを用いカルボキシル基とアミド結合を形成できる。同様に、アスパラギン酸及びグルタミン酸はカルボキシル基を有することから、カルボジイミドを用い一級アミンとアミド結合を形成することができる。しかしながら、このような側鎖の官能基を利用する固定化反応は、蛋白質のアミノ酸配列に依存すること、また、蛋白質中には同種のアミノ酸が複数含まれることから固定化部位を特定できない、複数の箇所固定化される可能性を排除できないなどの問題がある。

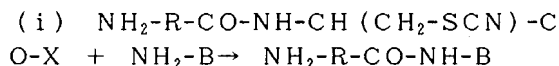
## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、蛋白質のカルボキシ末端のカルボキシル基を介して固定化する反応を開発することにより、蛋白質をカルボキシ末端の一箇所且つ主鎖を介して結合する手段を提供することを課題とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、既にシアノシステイン残基を介したアミド結合形成反応を見だし、それを利用したペプチド鎖合成反応を発明している(特開平10-45798)。

【0006】シアノシステイン残基を介したアミド結合形成反応は、反応式



〔式中、Rは任意のアミノ酸配列、Xは、OHもしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列、Bは任意の化合物を表す〕で表される。本発明者らは、この反応において、Bは任意の化合物であることから、一級アミンを官能基として有する固定化担体を利用することにより、蛋白質をカルボキシ末端で固定化できるとの着想を得た。

【0007】しかしながら、蛋白質は、一般に式  

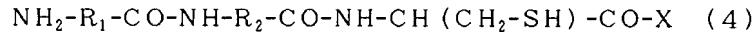
$$\text{NH}_2\text{-R-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-COOH}$$
 なる配列を持たないことから、上記反応はすぐ蛋白質に応用できないことが問題として挙げられた。

## 【0008】蛋白質は、一般式(2)

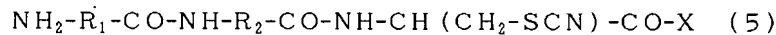


〔式中、 $\text{R}_1$ は任意のアミノ酸配列を表す〕で表すことができる。そこで、本発明者らは、固定化の対象となる蛋白質に、一般式(3)

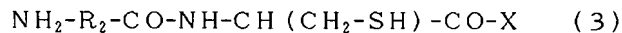
[式中、 $R_2$ は任意のアミノ酸配列、 $X$ は、 $OH$ もしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表す]で表さ



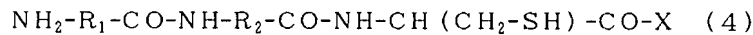
[式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は任意のアミノ酸配列、 $X$ は、 $OH$ もしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表す]



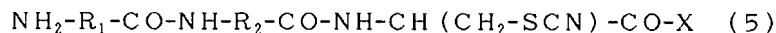
[式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は任意のアミノ酸配列、 $X$ は、 $OH$ もしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表す]で示されるシアノ基を有する蛋白質に転換し、利用することを考案した。そして、本発明者らは、考案した方法に従い融合蛋白質の作製、シアノ化および固定化反応が



[式中、 $R_2$ は任意のアミノ酸配列、 $X$ は、 $OH$ もしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表す]で表さ



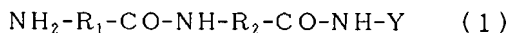
[式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は任意のアミノ酸配列、 $X$ は、 $OH$ もしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表す]



[式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は任意のアミノ酸配列、 $X$ は、 $OH$ もしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表す]で示されるシアノ基を有する蛋白質に転換し、これを一般式(6)



[式中、 $Y$ は任意の固定化担体を表す]で示される固定化担体に作用させることにより、一般式(1)



[式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は任意のアミノ酸配列、 $Y$ は任意の固定化担体を表す]で示される固定化蛋白質を生成させる方法及び一般式(1)で示される固定化蛋白質に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明を実施するにあたり、一般式(2)「 $NH_2-R_1-COOH$ 」で示される蛋白質の固定化のためには、これを一般式(4)「 $NH_2-R_1-CO-NH-R_2-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-X$ 」で示される融合蛋白質に転換する必要がある。その転換法は、いわゆる組み替えDNA手法を用いて行うことができる。即ち、一般式(2)で示される蛋白質をコードする遺伝子及び一般式(3)「 $NH_2-R_2-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-X$ 」で示されるペプチド配列をコードする遺伝子を結合することにより、一般式(4)で示される融合蛋白質をコードする遺伝子を作製し、これを大腸菌などの宿主生物で発現させ、その後、発現した蛋白質を分離精製することにより、目的とする融合蛋白質を作製することができる。このような融合蛋白質は公知技術を利用することにより、当業者であれば誰でもが作製できることから、一般式(4)で示される融合蛋白質の作製方法で本発明が限定されないことは、明白である。

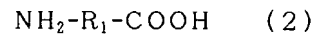
【0011】一般式(4)から、一般式(5)「 $NH_2-$

れるペプチドが結合した蛋白質、即ち一般式(4)

で表される融合蛋白質を作製し、この融合蛋白質のSH基をシアノ化することにより、一般式(5)

実際に起こることを示し、本発明を完成させた。

【0009】即ち、本発明は、一般式(2)



[式中、 $R_1$ は任意のアミノ酸配列を表す]で表すことができる蛋白質の固定化を行うにあたり、一般式(3)

れるペプチドが結合した蛋白質、即ち一般式(4)

で表される融合蛋白質を作製し、この融合蛋白質のSH基をシアノ化することにより、一般式(5)

$R_1-CO-NH-R_2-CO-NH-CH(CH_2-SCN)-CO-X$ 」への転換、いわゆるシアノ化反応は、シアノ化試薬を用いて行うことができる。

【0012】シアノ化試薬としては、通常、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(2-nitro-*t*-thiocyanobenzonic acid (NTCB))

(Y. Degani, A. Ptchornik, Biochemistry, 13, 1-11 (1974)に記載)または、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボロ酸(1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP))などを用いる方法が簡便である。NTCBおよびCDAPは市販のものをそのまま用いることができる。NTCBを用いたシアノ化は、pH7-9の間で効率よく行うことができ、且つ遊離するチオニトロ安息香酸の412nmの吸光度の増加(分子吸光係数=13,600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)で反応効率を調べることができる。また、SH基のシアノ化は文献(J. Wood & Catsipoulas, J. Biol. Chem. 233, 2887 (1963))に記載の方法に従っても行うことができる。従って、シアノ化の手法によって、本発明が制限を受けないことは明白である。

【0013】本発明に用いられる一般式(6)「 $NH_2-Y$ 」で示される固定化担体としては、一級アミノ基を有する不溶性担体であれば何でも用いることができ、例えばガラスビーズ等の無機質担体、天然又は合成高分子からなるラテックスやビーズ、天然又は合成高分子からなる繊維等の有機質担体等、通常の担体を使用することができる。一級アミノ基を有する市販の担体としては、例えばアミノ-セルロファイン(商品名:生化学工業で販売)、AF-アミノトヨパール(商品名:TOSOHで

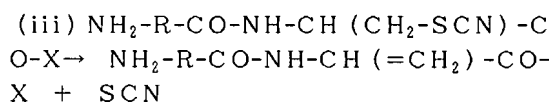
販売)、EAH-セファローズ4B及びリジン-セファローズ4B(商品名:アマシャムファルマシアで販売)、ボラス20NH(商品名:ベーリンガーマンハイムで販売)などが利用可能である。また、シラン化合物で一級アミノ基を有する化合物(例えば、3-アミノプロピルメトキシシランなど)を用いてガラスビーズなどに一級アミノ基を導入し、利用することも可能である。従って、固定化担体の種類で本発明が制限を受けないことは明白である。

【0014】一般式(5)「 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SCN)-CO-X}$ 」で示されるシアノ化された融合蛋白質と、一般式(6)「 $\text{NH}_2\text{-Y}$ 」で示される固定化担体の反応は、弱アルカリ条件下(pH8~10)に、室温で行うことができる。この反応の早さ及び効率、一般式(5)「 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SCN)-CO-X}$ 」で示される融合蛋白質のXによって左右される。Xとしては、OHもしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列が適するが、XがOHの場合は、反応が非常に穏やかに進み終了するまでに数日から約1週間を要する。Xとしてアラニン、グリシン、バリンなどのアミノ酸を用いた場合は反応が速やかに進行し、数時間から約1日で反応が完了する。その他のアミノ酸を用いた場合も同様であるが、Xとしてシステインを用いることができないことは、シアノ化の制御ができないこと、即ち一般式(4)から、一般式(5)の反応の制御ができないことから明らかである。Xとしてペプチドを用いることも可能であるが、一般式(4)で示される融合蛋白質の作製の経済面で不利益である。本発明の実施例では、Xとしてアラニンを用いているが、Xの種類で本発明は制限されないことは明白である。

【0015】固定化反応を行う溶媒としては、一般式(5)で示されるシアノ化した融合蛋白質が溶ける溶媒で、且つpHを調整できる溶媒であれば利用可能である。リン酸緩衝液、ほう酸緩衝液などの種々の緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類の他、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどが利用可能である。反応温度は、室温で高い反応効率を得られるが、用いる溶媒が凍結もしくは沸騰しない範囲、及び一般式(5)で示されるシアノ化した融合蛋白質が、変性の結果凝集しない温度範囲であれば問題なく用いることができる。

【0016】本発明で用いるシアノシステインが関与する反応には、副反応として加水分解反応、即ち反応式(ii)  $\text{NH}_2\text{-R-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SCN)-CO-X} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_2\text{-R-COOH} + \text{ITC-CO-X}$

[式中、Rは任意のアミノ酸配列、Xは、OHもしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列、ITCは2-イミノタゾリデン-4-カルボキシル基を表す]及び反応式



[式中、Rは任意のアミノ酸配列、Xは、OHもしくは任意のアミノ酸もしくはアミノ酸配列を表す]が起こりうるが、可能な副反応から生成する反応物は全て溶媒に溶けるため、反応後、固定化担体を適当な溶媒で洗うことにより副反応生成物を取り除くことができる。従って、本発明で用いられる固定化反応により、作製される固定化酵素は、全て一般式(1)「 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-Y}$ 」[式中、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は任意のアミノ酸配列、Yは任意の固定化担体を表す]で表され、目的とする蛋白質のカルボキシ末端がアミノ酸配列 $\text{R}_2$ を介して、一箇所で固定化担体に結合する。このように化学的に単一の固定化酵素は、従来の固定化反応では達成することができず、本発明によりはじめて達成されたものである。

【0017】このようにして得られた固定化蛋白質の特徴としては、担体にカルボキシ末端が一箇所だけで結合していることが挙げられるが、このことにより蛋白質の機能が良好に発揮される。例えば、固定化蛋白質として触媒機能を有する酵素蛋白質を用いた場合、温度を上げるとか、変性剤を加えることにより一度変性させると触媒機能を失うが、本発明の固定化によって作製した固定化酵素は、変性させる条件を取り除くことにより、その機能を完全に再生することができる。

【0018】蛋白質は、アミノ酸が一次元に繋がって構成されているが、その機能を発揮するためには3次元的に正しく折り畳まれなければならない。正しく折り畳まれた構造を、蛋白質の高次構造と呼ぶが、蛋白質の高次構造は、蛋白質を構成するアミノ酸配列によって決められている。従って、本来的に蛋白質は、その溶媒条件(即ち、温度、pH、塩濃度、変性剤の有無など)を変え、一度変性させ高次構造を失わせても、再度高次構造を形成する溶媒条件に戻すと、もとの高次構造を取るべきものである。この性質は、蛋白質変性の可逆性と称されるが、実際蛋白質を取り扱ってみると、特別な蛋白質を除いて、変性の可逆性が観測されることが全くといって良いほどない。この原因は、蛋白質変性の可逆性が、蛋白質分子間の相互作用を無視できる場合に成り立つことであり、通常溶液中で蛋白質を取り扱う際には、蛋白質分子間の衝突、即ち、相互作用が無視できないことにあると考えられる。蛋白質が互いに相互作用する条件下では、一度変性した蛋白質が再度高次構造を形成する際に、分子間凝集を起こし、もはや正しい高次構造を取ることができなくなるため、変性の可逆性を達成することができない。

【0019】本発明の、蛋白質固定化方法に従うと、蛋白質のカルボキシ末端だけが担体に固定化されるため、固定化された蛋白質同士は互いに衝突することができな

くなる。このことは、変性の可逆性にとって障害となる分子間相互作用の問題を解消していることになる。また、カルボキシ末端で固定化した場合は、それ以外のところで固定化した場合に比べて、固定化の束縛を少なくすることができる。そのため、アミノ酸配列中の結合角等化学結合の回転などの自由度は、非固定化酵素と同等であり、高次構造形成それ自体にとってなら問題は生じないはずである。このことは、蛋白質の可逆的変性を保証している。即ち、本発明者らは、本発明の固定化方法を用いて作製される固定化酵素は、一度溶媒条件を変えて変性させても、元の溶媒条件にすると、完全にもとの機能を回復すること、即ち、変性の完全可逆化ができるという着想を得た。そして、このことを確かめるため、酵素機能の回復を指標とした変性の可逆性を測定し、変性の完全可逆化が達成されていることを示し、特許請求の範囲の請求項3及び4に記載の発明の完成を確認した。

【0020】本発明の蛋白質固定化方法が実際有効であることを示すために、アミノ酸数159個よりなる大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素の変異酵素(AS-DHFRと略す)を用いて実証した。以下に、本発明の実施例を示す。

【0021】

【実施例】つぎに、実施例により本発明を説明するが、これらの具体例は本発明を限定するものではない。

〔実施例1〕固定化用ジヒドロ葉酸還元酵素の作製  
本実施例においては、一般式(2)に該当する蛋白質として、AS-DHFRを用いる。

【0022】AS-DHFRのアミノ酸配列を配列番号:1に示す。

【0023】本実施例においては、AS-DHFRを一般式(4)で表される配列に改変するために、一般式(3)に該当する配列としてGly-Gly-Gly-Gly-Cys-Alaを用い、AS-DHFRの159番目のアルギニンのカルボキシ末端側に付加した固定化用ジヒドロ葉酸還元酵素(AS-G4CAと略す)を遺伝子工学的に作製した。

【0024】一般式(4)に該当するAS-G4CAのアミノ酸配列を配列番号:2に示す。

【0025】AS-G4CAの作製は、AS-DHFRの遺伝子を用いて遺伝子工学的に行った。すでに、AS-DHFRの遺伝子が既知である(M. Iwakura, B. E. Jones, J. Luo, & C. R. Matthews, J. Biochemistry, 117, 480-488 (1995)に記載)。

【0026】該遺伝子の塩基配列を配列番号:3に示す。

【0027】AS-DHFRの遺伝子は「pTZDHFR20」と名付けられたプラスミドに組み込まれている

(M. Iwakura, B. E. Jones, J. Luo, & C. R. Matthews, J. Biochemistry, 117, 480-488 (1995)に記載)。

【0028】この遺伝子配列を基に、2本のプライマーDNA、5'-GGGGATCCTC TTGACAA TTA GTTA ACTATT TGTTATAATG TATTC-3' (配列番号:4)及び 5'-GGGGATCCCT TATGCACAGC CACCG CCACC ACGACGCTCG AGGATTTC G-3' (配列番号:5)を用いることにより、pTZDHFR20を鋳型として、PCR法により増幅することにより、AS-G4CAを発現できる遺伝子配列を作製した。

【0029】該遺伝子の塩基配列を配列番号:6に示す。

【0030】増幅して得られたDNAを制限酵素BamHIで切断後、BamHIで切断したクローニングベクターpUC19と結合し、得られた組み替えプラスミドを大腸菌に導入することにより、AS-G4CAを大腸菌菌体中に発現できた。

【0031】この大腸菌を、3リッターの培地(15gの食塩、15gの酵母エキス、24gのトリプトン、30mgのアンピシリンナトリウムを含んでいる)で、37度で一晩培養し、湿重量約10gの菌体を得た。この菌体の無細胞抽出液に、ストレプトマイシン硫酸処理、硫安分画、メソトレキセートアフィニティクロマトグラフィー及びDEAEトヨパールクロマトグラフィーの精製操作を施すことにより、均一にまで蛋白質を精製し、約100mgの均一なAS-G4CAが得られた。AS-G4CAの蛋白質濃度は、AS-DHFRの280nmの分子吸光係数 $31100\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて、280nmの吸光度より決定した。

【0032】〔実施例2〕固定化用ジヒドロ葉酸還元酵素のシステイン残基のシアノ化

AS-G4CAの配列中164番目のアミノ酸であるシステイン残基のシアノ化は、5mMのエチレンジアミン4酢酸(EDTA)を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液、pH7.4、中で、AS-G4CA(約0.032mM)の5倍量(0.16mM)の2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(NTCB)を加え、室温で4時間反応させることにより行った。遊離するチオニトロ安息香酸の412nmの吸光度の増加(分子吸光係数 $=13,600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )から、ほぼ定量的にシステイン残基がシアノ化されたことが確かめられた。

【0033】シアノ化反応液からの未反応のNTCB及びチオニトロ安息香酸の除去は、セファデックスG50カラム(カラムサイズ:φ25×150mm)を用いたゲル濾過により行った。溶離液としては、5mMのエチレンジアミン4酢酸(EDTA)を含む10mMトリス

塩酸緩衝液、pH 7.4を用いた。

【0034】〔実施例3〕シアノ化された蛋白質の固定化

得られたシステインがシアノ化されたAS-G4CA (AS-G4cyanoCAと称する) 15mg ( $8.3 \times 10^{-7}$  moles) 用いて、5mlのアミノ-セルロファイン (商品名: 生化学工業で販売; アミン含有量約  $10^{-5}$  moles  $\text{NH}_2/\text{ml}$  ゲル) と混合し、室温で24時間反応させた。溶液中に遊離蛋白質を280nmの吸光度から算出したところ11.8mgが溶液中に存在することから、固定化反応に用いたAS-G4cyanoCAの約20%が固定化されていることが推定された。

【0035】得られた固定化酵素をカラムに詰め、一度4Mの塩酸グアニジン溶液を通し洗った後、10mMリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化した。これにDHFRの強力な阻害剤であるメソトレキセート (MTX)

(0.1mM) を通し固定化した蛋白質に結合させた後、1MのKClを含む10mMリン酸緩衝液、pH7.0で非特異的に結合したMTXを洗い出し、その後、4Mの塩酸グアニジン溶液を流すことにより、固定化蛋白質を変性させ、結合したMTXを溶出させ、溶出したMTXを回収し、回収MTXの量を測定した (MTXの分子吸光係数:  $22100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )。その結果、 $1.7 \times 10^{-7}$  molesのDHFRが固定化されていることが示された。この量は、反応後の溶液中の蛋白質の減少から求めた値とほぼ一致した。

【0036】〔実施例4〕固定化酵素の活性測定  
添付図1に、固定化酵素活性測定のための装置の概略図を示す。

【0037】一定量の固定化酵素 (約0.2ml) をカラムに充填し、ペリスタポンプでカラムに反応液を一定速度で注入し、連続的に反応を行わせ、カラムから流出した反応液を、分光光度系のフローセルに導き、340nmの吸光度を連続的にモニターすることにより酵素活性を測定した。この際、カラム全体をウォーターバスに入れ、固定化酵素を処理する温度制御を行った。使用した酵素活性測定用反応液の組成は、次のとおりであった。

10mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0

0.1mM NADPH

0.05mM ジヒドロ葉酸

14mM 2-メルカプトエタノール

【0038】ジヒドロ葉酸還元酵素の反応は、反応式  
ジヒドロ葉酸 + NADPH  $\rightarrow$  テトラヒドロ葉酸 + NADP<sup>+</sup>  
を触媒する。

【0039】この反応に伴う基質の減少は、340nmの吸光度の減少で追跡することができる (反応前後の分子吸光係数の差 ( $\Delta \epsilon_{340} = 11800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ))。

【0040】酵素活性を定量的に表現するために、基質

変換率 (% conversion) を以下のように定義し、測定した。

【0041】 $\% \text{ conversion} = 100 \times \{A(1) - A(2)\} / \{A(1) - A(3)\}$

ここで、A(1)は、固定化酵素カラムを取り除き、反応液だけをフローセルに導き、測定した340nmの吸光度の値、A(2)は、固定化酵素カラムを繋ぎ、反応液を連続的に流し、一定に落ちついたときの340nmの吸光度の値、A(3)は、反応液に大過剰の酵素を添加して、酵素反応を終了した反応液を流したときの340nmの吸光度の値である。

【0042】15度で、一定の固定化酵素 (約0.5mg) の固定化酵素量を用いた時の、% conversion値の流速依存性を示している。

【0043】1ml/min 以上の流速で直線的な流速依存性が認められた。酵素の変性状態を測定するために、これ以後の測定は、15度での% conversion値が80%を示す流速条件、2ml/minを選んだ。

【0044】ウォーターバスの温度を変化させ連続的に測定することにより、添付図2に示す結果が得られた。即ち、温度を上昇させることにより、約40度までは、% conversion値の上昇が見られたが、それ以上に温度を上げると、60度まではそれほど変化が見られなかったが、さらに温度を上げると急激に% conversion値の減少が起こり、75度では、完全に酵素機能が失われた。さらに、温度を85度まで上げて測定した後、温度を下げていくと、75度から60度の間に急激な% conversion値の上昇が見られ、その後30度までは徐々にほぼ同程度の値を示したが、それより温度を下げると、徐々に減少し、15度では、測定開始時 (15度) の % conversion値と全く同じレベルに落ちついた。この結果は、固定化酵素が60度から75度の間に熱変性し機能を失うが、温度を元に戻すと完璧にその環境 (温度) 条件での活性を示すこと、即ち、温度変性に対して完全な可逆性 (失活した機能の回復) を示している。

【0045】〔比較例1〕酵素の熱処理

固定化していないAS-DHFR (15mM) を、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85度の各温度で30分間熱処理した後、0度に冷却し、その後酵素活性を測定し、熱処理しない酵素活性と比較し、残存活性を調べた。熱処理の緩衝液として、10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) とDHFR酵素活性測定液を用いたときの温度と残存活性の関係を添付図3に示している。いずれの場合でも、70度以上の熱処理により固定化していないAS-DHFRは、完全にその活性を不可逆的に失った。

【0046】〔実施例5〕固定化酵素のオートクレーブ

## 処理

上記実施例3で得られた固定化酵素をカラムに詰めたま  
ま、オートクレーブで100、105、110、11  
5、及び120度の各温度で5分間処理した後、室温に  
戻してから、実施例4の固定化酵素の活性測定方法に従  
い残存活性を測定した。この際、熱処理時間は、設定温  
度に達してから時間であり、実際には設定時間に加え  
て、温度が上昇する時間とオートクレーブを冷やす間の  
時間、固定化酵素は加熱されている。結果として、調べ  
たいずれの温度においても、100%の残存活性が示さ  
れた。

## 【0047】

【発明の効果】本発明では、蛋白質をカルボキシ末端の  
カルボキシ基を介して担体に固定化することができる。  
本発明の固定化方法を用いて作製される固定化酵素は、  
一度溶媒条件を変えて変性させても、元の溶媒条件にす  
ると、完全にもとの機能を回復すること、即ち、変性の  
完全可逆化ができるものであり、実用的価値の高いもの  
である。

## 【0048】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：159

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

|  |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|
| Met-Ile-Ser-Leu-Ile-Ala-Ala-Leu-Ala-Val-Asp-Arg-Val-Ile-Gly- |     |     |     |
| 1  | 5   | 10  | 15  |
| Met-Glu-Asn-Ala-Met-Pro-Trp-Asn-Leu-Pro-Ala-Asp-Leu-Ala-Trp- |     |     |     |
|  | 20  | 25  | 30  |
| Phe-Lys-Arg-Asn-Thr-Leu-Asn-Lys-Pro-Val-Ile-Met-Gly-Arg-His- |     |     |     |
|  | 35  | 40  | 45  |
| Thr-Trp-Glu-Ser-Ile-Gly-Arg-Pro-Leu-Pro-Gly-Arg-Lys-Asn-Ile- |     |     |     |
|  | 50  | 55  | 60  |
| Ile-Leu-Ser-Ser-Gln-Pro-Gly-Thr-Asp-Asp-Arg-Val-Thr-Trp-Val- |     |     |     |
|  | 65  | 70  | 75  |
| Lys-Ser-Val-Asp-Glu-Ala-Ile-Ala-Ala-Ala-Gly-Asp-Val-Pro-Glu- |     |     |     |
|  | 80  | 85  | 90  |
| Ile-Met-Val-Ile-Gly-Gly-Gly-Arg-Val-Tyr-Glu-Gln-Phe-Leu-Pro- |     |     |     |
|  | 95  | 100 | 105 |
| Lys-Ala-Gln-Lys-Leu-Tyr-Leu-Thr-His-Ile-Asp-Ala-Glu-Val-Glu- |     |     |     |
|  | 110 | 115 | 120 |
| Gly-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Asp-Tyr-Glu-Pro-Asp-Asp-Trp-Glu-Ser- |     |     |     |
|  | 125 | 130 | 135 |
| Val-Phe-Ser-Glu-Phe-His-Asp-Ala-Asp-Ala-Gln-Asn-Ser-His-Ser- |     |     |     |
|  | 140 | 145 | 150 |
| Tyr-Ser-Phe-Glu-Ile-Leu-Glu-Arg-Arg                          |     |     |     |
|  | 155 | 159 |     |

## 【0049】

配列番号：2

配列の長さ：165

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

|  |    |    |    |
|--|----|----|----|
| Met-Ile-Ser-Leu-Ile-Ala-Ala-Leu-Ala-Val-Asp-Arg-Val-Ile-Gly- |    |    |    |
| 1  | 5  | 10 | 15 |
| Met-Glu-Asn-Ala-Met-Pro-Trp-Asn-Leu-Pro-Ala-Asp-Leu-Ala-Trp- |    |    |    |
|  | 20 | 25 | 30 |



Phe-Lys-Arg-Asn-Thr-Leu-Asn-Lys-Pro-Val-Ile-Met-Gly-Arg-His-  
                   35                  40                  45  
 Thr-Trp-Glu-Ser-Ile-Gly-Arg-Pro-Leu-Pro-Gly-Arg-Lys-Asn-Ile-  
                   50                  55                  60  
 Ile-Leu-Ser-Ser-Gln-Pro-Gly-Thr-Asp-Asp-Arg-Val-Thr-Trp-Val-  
                   65                  70                  75  
 Lys-Ser-Val-Asp-Glu-Ala-Ile-Ala-Ala-Ala-Gly-Asp-Val-Pro-Glu-  
                   80                  85                  90  
 Ile-Met-Val-Ile-Gly-Gly-Gly-Arg-Val-Tyr-Glu-Gln-Phe-Leu-Pro-  
                   95                  100                 105  
 Lys-Ala-Gln-Lys-Leu-Tyr-Leu-Thr-His-Ile-Asp-Ala-Glu-Val-Glu-  
                  110                 115                 120  
 Gly-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Asp-Tyr-Glu-Pro-Asp-Asp-Trp-Glu-Ser-  
                  125                 130                 135  
 Val-Phe-Ser-Glu-Phe-His-Asp-Ala-Asp-Ala-Gln-Asn-Ser-His-Ser-  
                  140                 145                 150  
 Tyr-Ser-Phe-Glu-Ile-Leu-Glu-Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala  
                  155                 160                 165

【0050】

配列番号: 3

配列の長さ: 554

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列

TTGACAATTA GTTAACTATT TGTATAATG TATTCATGAG CTTAACTAAC TAATCCGAA 60  
 AAGGAGGAAC TTCCATGATC AGTCTGATTG CGGCGCTAGC GGTAGATCGC GTTATCGGCA 120  
 TGGAAAACGC CATGCCATGG AACCTGCCTG CCGATCTCGC CTGGTTTAAA CGCAACACCT 180  
 TAAATAAACC CGTGATTATG GGGCGCCATA CCTGGGAATC AATCGGTAGG CCTTTGCCCG 240  
 GCCGCAAAAA TATTATCCTC AGCAGTCAAC CCGGGACCGA TGATCGGGTT ACCTGGGTTA 300  
 AATCGGTCTGA CGAAGCCATC GCGGCCGAG GTGACGTACC AGAAATCATG GTGATTGGCG 360  
 GCGGACGCGT TTATGAACAG TTCTTGCCAA AAGCGCAAAA GCTTTATCTG ACGCATATCG 420  
 ATGCAGAAGT GGAAGGGCAG ACCCATTTTC CGGATTACGA GCCGGATGAC TGGGAATCGG 480  
 TATTCAGCGA ATTCACGAT GCTGATGCGC AGAACTCGCA TAGCTATTCG TTCGAAATCC 540  
 TCGAGCGTCG TTAA 554

【0051】

配列番号: 4

配列の長さ: 45

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GGGGATCCTC TTGACAATTA GTTAACTATT TGTATAATG TATTC 45

【0052】

配列番号: 5

配列の長さ: 50

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

G G G G A T C C C T T A T G C A C A G C C A C C G C C A C C A C G  
 A C G C T C G A G G A T T T C G 50

【0053】

配列番号：6

配列の長さ：650

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

G G G G A T C C T C T T G A C A A T T A G T T A A C T A T T T G T T A T A A T G T A T T C A T G A G C T T A A C T A A C 60  
 T A A T C C G G A A A G G A G G A A C T T C C A T G A T C A G T C T G A T T G C G G C G C T A G C G G T A G A T C G C 120  
 G T T A T C G G C A T G G A A A A C G C A T G C C A T G G A A C T G C C T G C C G C C G A T C T C G C T G G T T A A A 240  
 C G C A A C A C C T A A A T A A A C C C G T G A T T A T G G G G C G C A T A C T G G G A A T C A A T C G G T A G G 300  
 C C T T T G C C C G G C C G A A A A A T A T T A T C C T C A G C A G T C A A C C G G G A C C G A T G A T C G G G T T 360  
 A C C T G G G T T A A A T C G G T C G A C G A A G C C A T C G C G C C G C A G T G A C G T A C C A G A A A T C A T G 420  
 G T G A T T G G C G C G G A C G C G T T A T G A A C A G T T C T T G C C A A A A G C G C A A A A G C T T T A T C T G 480  
 A C G C A T A T C G A T G C A G A A G T G G A A G G C G A C A C C A T T T T C C G A T T A C G A G C C G A T G A C 540  
 T G G G A A T C G G T A T T C A G C G A A T T C C A C G A T G C T G A T G C G C A G A A C T C G A T A G C T A T T C G 600  
 T T C G A A A T C C T C G A G C G T C G G T G C C G G T G C T G T G C A T A G G G A T C C C C 650

【図面の簡単な説明】

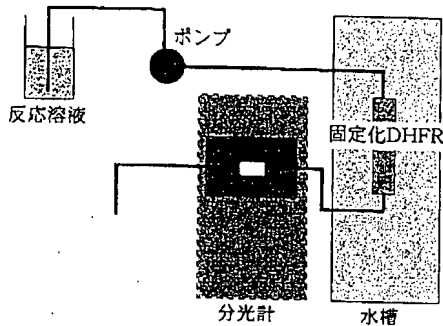
【図1】 固定化酵素活性測定のための装置の概略図である。

【図2】 固定化酵素の温度と活性（基質交換率）の関係

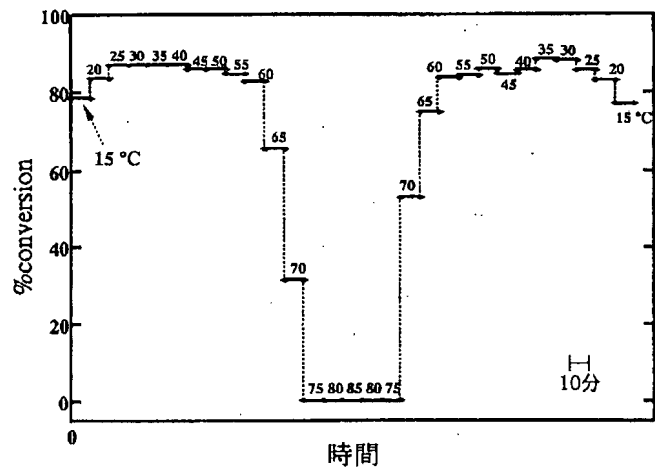
を示す図である。

【図3】 固定化及び固定化していない酵素の種々の温度での熱処理と残存活性の関係を示す図である。

【図1】

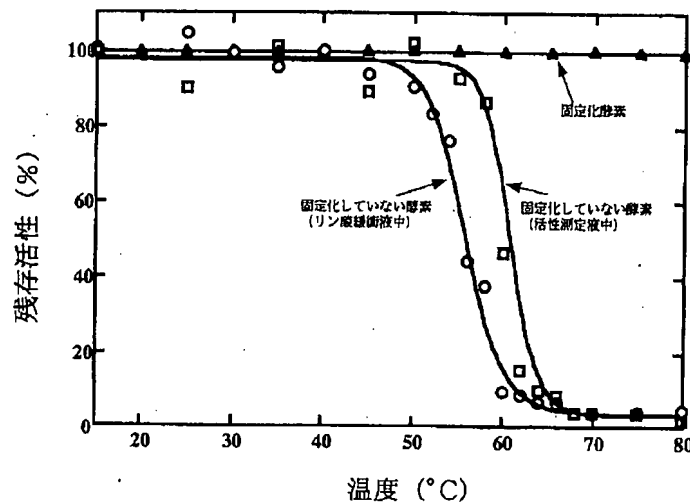


【図2】



温度一定に保つため、各温度で10分間静置した後に測定

【図3】



## 【手続補正書】

【提出日】平成11年8月4日(1999. 8. 4)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

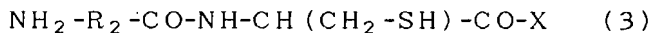
【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

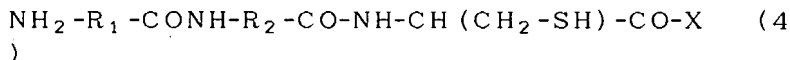
【補正内容】

【特許請求の範囲】

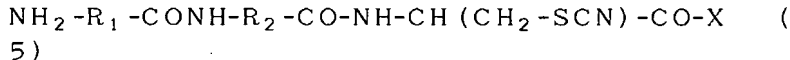
【請求項1】 一般式(1)



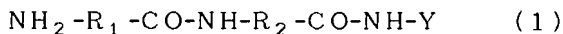
で表されるペプチドを結合させて、一般式(4)



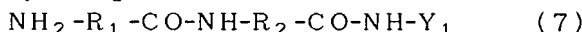
で表される融合蛋白質を作製し、この融合蛋白質のSH 基をシアノ化し、得られた一般式(5)



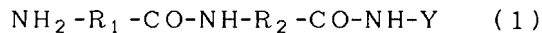
で表されるシアノ基を有する蛋白質を、一般式(6)



で表される、蛋白質の主鎖のカルボキシル末端一箇所で  
固定化担体に固定化された固定化蛋白質を生成させる方法。  
〔上記各式中、 $\text{R}_1$  及び  $\text{R}_2$  は任意のアミノ酸配列



で表される、蛋白質の主鎖のカルボキシル末端一箇所で  
固定化担体に固定化された固定化蛋白質を変性処理後、  
変性処理前の条件下に戻すことを特徴とする機能を損な  
わない固定化蛋白質の変性処理方法。〔式中、 $\text{R}_1$  及び  
 $\text{R}_2$  は任意のアミノ酸配列を表し、 $\text{Y}_1$  は変性条件下に



で表される、蛋白質の主鎖のカルボキシル末端一箇所で  
固定化担体に固定化された固定化蛋白質。〔式中、 $\text{R}_1$   
及び  $\text{R}_2$  は任意のアミノ酸配列を表し、 $\text{Y}$  は任意の固定  
化担体を表す。〕

【請求項2】 一般式(2)



で表される蛋白質に、一般式(3)

で表される固定化担体に作用させることを特徴とする、  
一般式(1)

を表し、 $\text{X}$  は  $\text{OH}$  又は任意のアミノ酸もしくはアミノ酸  
配列を表し、 $\text{Y}$  は任意の固定化担体を表す。〕

【請求項3】 一般式(7)

において安定な固定化担体を表す。〕

【請求項4】 変性処理が加熱殺菌処理であることを特  
徴とする請求項3に記載の固定化蛋白質の変性処理方  
法。